

Fixation au mélange Glutaraldéhyde 25% + Pluronic 10%

0,25% final de Glutaraldéhyde et 0,01% final de Pluronic (Poloxamer 188)

Sous hotte chimique préparer le mélange Glutaraldéhyde + Pluronic (Poloxamer 188) :

1000µl de Glutaraldéhyde 25% + 100µl de Pluronic 10% .

Mélanger par renversement (le mélange « mousse »)

Les échantillons sont fixés à **0,25% final de Glutaraldéhyde et 0,01% final de Pluronic**

Le tableau suivant résume les proportions en fonction des volumes finaux souhaités :

Volume Echantillon d'eau de mer (µl)	Volume solution Gluta+pluronic (µl)	Volume final dans le cryotube (µl)
990	10	1000
1485	15	1500
1782	18	1800
1980	20	2000
4455	45	4500

↳ Mélanger (échantillon et fixateur) par retournement manuel de chaque cryotube 3 fois (éviter le vortex).

TRES IMPORTANT :

- Incuber **15 minutes** à **température ambiante** et à **l'obscurité avant de congeler les échantillons** (afin d'assurer la fixation optimale des cellules)
- Privilégier, si possible, la congélation dans de l'azote liquide (un conteneur sec type Deware ou Voyager est optimal)
- Si l'azote n'est pas disponible sur le navire de station, mais si un congélateur l'est, y mettre les cryotubes en attendant le retour au laboratoire, sinon conserver les échantillons dans la glacière jusqu'au retour au laboratoire, puis congeler au laboratoire.

De retour au laboratoire, conservez de préférence les échantillons dans l'azote liquide (bloque les phénomènes d'oxydation) sinon, à défaut, le stockage peut se faire dans un congélateur à -80°C. Eviter la congélation à -20°C, sauf si les analyses sont réalisées très rapidement après (dans le mois).

Le transfert d'échantillons congelés à la plateforme PRECYM doit être impérativement réalisé dans de la carboglace, par un transporteur spécialisé (Cryoexpress par exemple).

Références et infos produits :

Pluronic (ou Poloxamer 188) = surfactant non ionique, non toxique, utilisé en culture de cellules et cryoconservation. Le Pluronic sera à 0,01% final et associé au Glutaraldéhyde 0.25% final. Il limitera l'adhérence des cellules microbiennes sur les parois des cryotubes et les protégera lors des phases de congélation et décongélation. Il permettra une meilleure quantification des cellules lors des mesures en CMF. Modifications du protocole (concentration finale de Glutaraldéhyde et ajout de surfactant) d'après **Marie et al. 2014** et validées par les tests effectués par la communauté « pico-nano » du SOMLIT.

NB : A réception du Pluronic (Poloxamer 188) en flacon de 100ml : préparer des aliquots en tubes et de les conserver à -20°C, afin d'éviter toute contamination dans le temps.

- **Glutaraldéhyde à 25%** Electron Microscopy Sciences (Ref produit : 16220)
<http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/chemicals/glutaraldehyde.aspx>
Chez FISHER SCIENTIFIC :
https://webshop.fishersci.com/insight2_fr/getProduct.do?productCode=10674511
- **Pluronic ou Poloxamer 188 solution (10%)**, 100ml chez SIGMA ALDRICH, référence
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p5556?lang=fr®ion=FR>